

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**

Molekulární biologie a biochemie organismů



**Lucie Schiebertová**

Toxicita hlinitých iontů v rostlinné buňce

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Kateřina Schwarzerová Ph.D.

Praha, 2011

***Prohlášení:***

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 9.5.2011

Podpis

***Poděkování:***

Ráda bych na úvod poděkovala svojí školitelce RNDr. Kateřině Schwarzerové Ph.D. za cenné rady při hledání studijních materiálů, trpělivost a přátelský přístup.

Dále také svojí mamince za trpělivost a sestře a svému příteli za vydatnou, nejen psychickou pomoc.

### ***Abstrakt:***

Hliník je třetí nejhojnější kov v zemské kůře a jeho toxické formy představují vážnou hrozbu pro produkci plodin v kyselých půdách, které tvoří téměř polovinu orné půdy. Za nejtoxičtější pro rostliny je považována iontová forma,  $Al^{3+}$ , která působí na apikální zóny kořenů a zastavuje kořenový růst ve velmi krátkém čase a v mikromolárních koncentracích. Na buněčné a molekulární úrovni hliník negativně působí na mnoho dějů a látek, mezi jinými například na buněčnou stěnu, cytoplazmatickou membránu, signální dráhy buněk, DNA, homeostázu vápníku a na četné enzymy v cytoplazmě. Ačkoliv je obtížné odlišit primární cíle hliníkové toxicity od jejích sekundárních efektů, právě porozumění primárnímu působení hliníku nám může objasnit jím působené zastavování růstu kořenů. Na druhou stranu, některé druhy rostlin vyvinuly mechanismy, které jim umožňují vyrovnat se s toxickým hliníkem v půdě. V budoucnu bude nutné se zaměřit na pochopení základních mechanismů toxicity hliníku a zároveň sjednotit naše vědění/poznatky a výzkumy tohoto tématu.

*Klíčová slova: Al toxicita, Al resistance/tolerance, fytotoxicita, Al stres, kyselá půda, růst kořenů*

### ***Abstract:***

Aluminium being the third most abundant metal in the earth's crust is in its toxic form a serious threat for crop productivity in acid soils, which comprise almost half of the arable land. As the most phytotoxic form is considered free ion  $Al^{3+}$ , which affects root growth by acting in the root apical zone, resulting in growth inhibition in a very short time at micromolar concentrations. At cellular and molecular level, many cell components are affected by aluminium toxicity including cell wall, plasma membrane, signal transduction pathways, calcium homeostasis, DNA and numerous cytoplasmic enzymes. Although it is difficult to distinguish the primary targets from the secondary effects so far, understanding of the target sites of aluminium toxicity is helpful to elucidate the mechanisms by which aluminium exerts its deleterious effects in root growth. On the other hand, some plant species have evolved mechanisms to cope with aluminium toxicity. In the future, the attention should be paid to basic mechanisms of aluminium toxicity and our understanding of the current problem should be unified.

*Key words: Al toxicity, Al resistance/tolerance, phytotoxicity, Al stress, acid soils, root elongation*

## **Obsah:**

1.	Úvod .....	6
2.	Chemie hliníku .....	8
3.	Vliv hliníku na rostlinu jako celek .....	9
4.	Toxicita hliníku .....	10
4.1.	Hliníkem způsobené zastavení růstu kořenů .....	10
4.2.	Mechanismus toxicity hliníku .....	12
4.2.1.	Interakce toxického hliníku a buněčné stěny .....	12
4.2.2.	Cytoplazmatická membrána .....	14
4.2.3.	Cytoplazma .....	15
4.2.4.	Signální dráhy .....	17
4.2.5.	Oxidativní stres způsobený toxickým hliníkem .....	20
5.	Resistence a tolerance rostlin vůči hliníku .....	21
5.1.	Mechanismy rezistence .....	23
5.2.	Mechanismy tolerance .....	28
5.3.	Působení boru a křemíku v odolnosti vůči toxickému hliníku .....	29
6.	Rostliny akumulující hliník a vyžadující hliník pro dobrý růst .....	30
7.	Závěr .....	31

### *Seznam použitých zkratk:*

DNA	-	deoxyribonukleová kyselina
pH	-	vodíkový exponent, kyselost
ATP	-	adenosintrifosfát
GTP	-	guanosintrifosfát
ABC transportní protein	-	„ATP Binding Cassette“
PLC	-	fosfolipáza C
PC-PLC	-	fosfatidylcholin-hydrolyzující fosfolipáza C
PLD	-	fosfolipáza D
PIP <sub>2</sub>	-	4,5-bisfosfát
DAG	-	diacylglycerol
PA	-	fosfatidové kyseliny
Ins(1,4,5)P <sub>3</sub>	-	inositol 1,4,5-trifosfát
NO	-	oxid dusnatý
NOS	-	syntáza oxidu dusnatého
AtMGT1	-	transportér hořčíku v <i>Arabidopsis</i>
ER	-	endoplazmatické retikulum
CAX	-	Ca <sup>2+</sup> výměníky v tonoplastu vakuol
IP <sub>3</sub>	-	inositol-1,4,5-trifosfát
ROS	-	reaktivní formy kyslíku
UDP - glukóza	-	uridindifosfát – glukóza
AUX1	-	„auxin rezistant 1“ protein transportu auxinu do buňky
TaALMT1	-	„Triticum aestivum aluminium-activated malate transporter“
ALMT	-	„aluminium-activated malate transporter“
HvAACT1	-	<i>Hordeum vulgare</i> „multidrug and toxic compound extrusion“
MATE	-	„multidrug and toxic compound extrusion“
OA	-	organické anionty
AltSB	-	<i>Sorghum moench</i> „aluminium-activated transport“
BnALMT1	-	<i>Brassica napus</i> „aluminium-activated malate transporter“
H <sup>+</sup>	-	vodíkový kationt
SOD	-	superoxid dismutáza
CAT	-	kataláza
APX	-	askorbát peroxidáza

## 1. Úvod

Přestože téměř sto let je známo, že toxické formy hliníku jsou hlavní příčinou inhibice kořenového růstu rostlin na kyselých půdách, hlavní mechanismus toxického účinku hliníku není dodnes uspokojivě vysvětlen. Dílčích úspěchů bylo dosaženo především v posledních letech pomocí metod molekulární biologie a genetiky, avšak stále v tomto směru zůstává více otázek než odpovědí. Hliník je nejhojnější kovový prvek a třetí nejvíce zastoupený prvek v zemské kůře. Toxicita hliníku ve vodních a pozemních systémech však nekoreluje s jeho celkovou koncentrací, ale je funkcí koncentrace biologicky aktivní frakce v roztoku (Horst, Wang a Eticha 2010). Jako nejdůležitější toxická forma je považován iont  $\text{Al}^{3+}$ , zatímco organické a anorganické hliníkové komplexy (vznikající při neutrálním pH) jsou považovány za méně toxické nebo netoxické (Kinraide, Ryan a Kochian 1992). Iont  $\text{Al}^{3+}$  se uvolňuje z jinak nerozpustných sloučenin především za nízkého pH. Odhaduje se, že asi 35% z celkové obdělávatelné půdy je půda kyselá ( $\text{pH} < 5,5$ ). Na kyselých půdách je produktivita plodin silně omezena zejména polyvalentními anionty a kationty a právě ionty hliníku jsou nejdůležitějším faktorem omezujícím růst a vývoj rostlin na kyselých půdách (Vonuekull a Mutert 1995).

Hlavním cílem hliníkové toxicity jsou buňky kořene a postihován je růst a vývoj kořene. Toxický hliník působí již v mikromolárních koncentracích, avšak míra toxicity se liší dle druhu rostliny a vlastností půdy (Ma *et al.* 2004). Obecně platí, že ionty  $\text{Al}^{3+}$  mají vliv na mnoho buněčných funkcí, ke kterým patří například inhibice buněčného dělení, snižování flexibility buněčné stěny, negativní vliv na funkci membránových transportérů a enzymů, narušení homeostáze  $\text{Ca}^{2+}$  iontů, narušení signalizačních drah, nebo inhibice replikace DNA (Rout, Samantaray a Das 2001, Sun *et al.* 2010). V cytoplasmě byl dále vliv  $\text{Al}^{3+}$  prokázán na cytoskelet, kořenové dýchání a spouštění oxidačního stresu. Obecně činí hliníkový stres rostliny více náchylné na celou škálu dalších stresů, zejména na sucho (Ma 2005a, Ma 2005b) a samozřejmě ovlivňuje příjem, dopravu a metabolismus základních živin jako Ca, Mg, K, P a Fe (Rout *et al.* 2001).

Některé rostlinné druhy si vyvinuly mechanismy, které jim umožňují přežít v kyselé půdě lépe než ostatním. Tyto mechanismy můžeme rozdělit na dvě hlavní strategie: mechanismy tolerance a rezistence, přičemž rozdíly mezi nimi se mohou vzájemně překrývat (Kochian, Hoekenga a Pineros 2004, Horst *et al.* 2010). Mechanismy tolerance umožňují rostlině bezpečně uschovat toxický hliník, jakmile vstoupí do symplastu, a to buď chelatací v cytosolu a tvorbou neškodných komplexů, nebo jeho izolací proti narušení metabolismu a funkcí organel. Mechanismy tolerance jsou rozšířené u druhů v regionech s kyselými půdami (např. tropy), kde schopnost vyrovnat se s toxicitou hliníku je základním předpokladem pro přežití. Některé rostliny tolerují vysoké koncentrace hliníku a hliník akumulují ve svých pletivech. Příkladem je čaj (*Camellia sinensis*) a pohanka (*Fagopyrum esculentum*)

(Ma, Ryan a Delhaize 2001). Mechanismy rezistence (vylučovací nebo odporovací) naopak brání hromadění toxického hliníku v symplastu. Minimalizují škodlivé interakce s plazmatickou membránou, buněčnou stěnou nebo jiným cílem v apoplastu tím, že hliníku zabraňují ve vstupu do buňky. Tyto mechanismy zahrnují produkci kořenových exudátů, které váží a detoxifikují kationty v apoplastu, a dále zahrnují též mechanismy pro vylučování hliníku ze symplastu (Matsumoto 2000, Ryan a Delhaize 2010). O mechanismech rezistence máme v současné době dobrou povědomost, neboť jde o způsob, jakým se toxickému působení hliníku brání mnoho běžných plodin jako pšenice, čirok, kukuřice, sója, ječmen, nebo modelových druhů rostlin jako je *Arabidopsis* a rýže. (Ryan a Delhaize 2010). Naproti tomu mechanismus toxicity hliníku v rostlinných buňkách je stále málo prozkoumaný.

Tato práce si klade za cíl zmapovat literaturu zabývající se problematikou toxicity hliníku a rezistence rostlin a přinést ucelený obraz tohoto v dnešní době žhavého, stále se rozvíjejícího, a hlavně v budoucnu velmi potřebného tématu.



## 2. Chemie hliníku

Hliník (chemická značka Al, latinsky *Aluminium*), je velmi lehký kov bělavě šedé barvy s atomovým číslem 13. Je nejhojnější kovový prvek a třetí nejvíce zastoupený prvek v zemské kůře po kyslíku a křemíku. Podle posledních dostupných údajů tvoří hliník 7,5 – 8,1% procent zemské kůry (Vonuekull a Mutert 1995). Díky velké reaktivitě hliníku se v přírodě setkáváme prakticky pouze s jeho sloučeninami. Vyskytuje se především v hlinito-křemičitanových minerálech, nejčastěji v živcích, přeměněných a vyvřelých horninách a v jílových minerálech v dobře zvětralé půdě. Nejběžnější horninou na bázi hliníku je bauxit ( $\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ) (Ma 2007). Hliník se prakticky nevyskytuje, téměř jako jediný z prvků I. - III. základní skupiny prvků periodické soustavy, v žádné živé tkáni, ať již rostlinné nebo živočišné. Nepovažuje se tedy za esenciální živinu – prvek.

Chemie hliníku je velmi komplexní a stále ještě není plně pochopena. Důvodem je široké spektrum polyjaderných anorganických a organokovových komplexů se silně se lišícími stabilitami, které hliník vytváří v přírodě v půdě a ve vodě. Toxicita hliníku se velmi liší podle toho, o jakou jeho chemickou formu iontu jde (Matsumoto 2000). Hliník je jako kov a ve sloučeninách při neutrálním pH netoxický, ale stává se velmi toxický pro všechny živé organismy, pokud je přítomen ve formě iontů, a to hlavně  $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$  (konvenčně a ze zvyku psáno pouze jako  $\text{Al}^{3+}$ ) v kyselém prostředí a  $\text{Al}[\text{OH}]_4^-$  v alkalickém prostředí. Experimentálně bylo dokázáno, že iont  $\text{AlO}_4\text{Al}_{12}(\text{OH})_{24}(\text{H}_2\text{O})_{12}^{7+}$  je nejvíce fyto toxický, nicméně je ale jasné, že nejrozšířenější toxická forma pro rostliny je trivalentní kationt  $\text{Al}^{3+}$  působící jako  $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$ , který se vyskytuje v kyselém prostředí (pH 4,5) (Kochian 1995). Hliník má v přírodě dva izotopy: stabilní izotop  $^{27}\text{Al}$  a radioizotop  $^{26}\text{Al}$ . V přírodě se vyskytuje prakticky pouze  $^{27}\text{Al}$ .  $^{26}\text{Al}$  je někdy používán jako indikační marker při biologických studiích, jeho použití je omezeno především vysokými výrobními náklady (Barabasz *et al.* 2002).

Vzhledem k mimořádně nízké rozpustnosti hliníku ve vodě je jeho obsah ve vodách velmi nízký, v rozmezí od 60 do 300  $\mu\text{g} / \text{l}$  při pH 5-9. Na kyselých půdách a též vinou kyselých dešťů se obsah toxických iontů hliníku zvyšuje díky acidifikaci půd i vod kde dochází k rozpouštění hliníkových sloučenin. Přítomnost hliníku ve vzduchu je závislá především na lidské činnosti. Průměrná koncentrace hliníku ve vzduchu spadá do rozmezí 50-5000  $\text{ng}/\text{m}^3$  (Barabasz *et al.* 2002). V jakých dávkách a jak moc je pro organismy toxický, případně jakým způsobem s nimi vůbec reaguje, záleží na mnoha faktorech. V neposlední řadě na druhu organismu a jeho toleranci k hliníku, popřípadě na dalších látkách v prostředí přítomných (P, Ca, Fe, Mg). V půdě ale většinou koncentrace  $\text{Al}^{3+}$  nepřekračuje 140  $\mu\text{M}$  (Ma *et al.* 2004).

### 3. Vliv hliníku na rostlinu jako celek

Příznaky toxicity hliníku nejsou na rostlině zprvu snadno identifikovatelné. Pokud se ovšem zaměříme na podzemní část, zaznamenáme toxický efekt hliníkových iontů již v prvních minutách působení. Hlavní symptom  $Al^{3+}$  toxicity u rostlin je totiž inhibice růstu kořene. Kořeny také vykazují vyšší známky buněčného poškození než jiné části rostliny. Toxicita hliníku může být pozorována v kořenovém systému zejména v kořenové špičce, přesněji v distální přechodové zóně, kde se buňky přestávají dělit a začínají se prodlužovat, a v laterálních kořenech, které zesílí, zhnědnou a jsou křehké. Kořenový systém jako celek je zkroucený s mnoha zavalitými bočními kořeny a postrádá jemné větvení (Poschenrieder *et al.* 2008). Takové kořeny jsou neefektivní při čerpání živin i vody (Mossor-Pietraszewska 2001).

Na listech se příznaky toxicity podobají příznakům nedostatku fosforu (P) - celková zakrnělost, malé, tmavě zelené listy a opožděné dospívání, červené zbarvení/zarudnutí výhonků, listí a listových žil, žloutnutí a smrt listových vrcholů. V některých případech se jeho toxicita projeví jako nedostatek vápníku ( $Ca^{2+}$ ), či snížení jeho transportu rostlinou (stáčení či kadeřavost mladých listů a kolaps růstových bodů nebo řapíků). Nadměrné množství toxického hliníku (nad 20  $\mu M$  a doba působení 24h) dokonce vykazuje příznaky nedostatku železa (chloróza listů) (Rout *et al.* 2001). Celkově se sníží fotosyntetická aktivita, listy jsou menší a je jich méně, postupně odumírají (Mossor-Pietraszewska 2001).

Kořenová inhibice růstu byla zjištěna 2-4 dny po zahájení klíčení semen (Rout *et al.* 2001). Obecně platí, že mladé sazenice jsou náchylnější k toxickému hliníku než starší rostliny (Rout *et al.* 2001)

## 4. Toxicita hliníku

### 4.1. Hliníkem způsobené zastavení růstu kořenů

Charakteristický a primární cíl toxicity hliníku je zastavení růstu kořenů. Nejcitlivější místo pro jeho působení je kořenová špička a tranzientní (přechodová) zóna kořene (u *Zea mays*), která se u kukuřice nachází asi 1-2mm od kořenového vrcholu vzhůru mezi apikálním meristémem a elongační zónou (viz. obrázek 1) (Delhaize a Ryan 1995, Sivaguru a Horst 1998).

Obrázek 1 - Model kořenové špičky u kukuřice ukazující různé vývojové zóny kořene

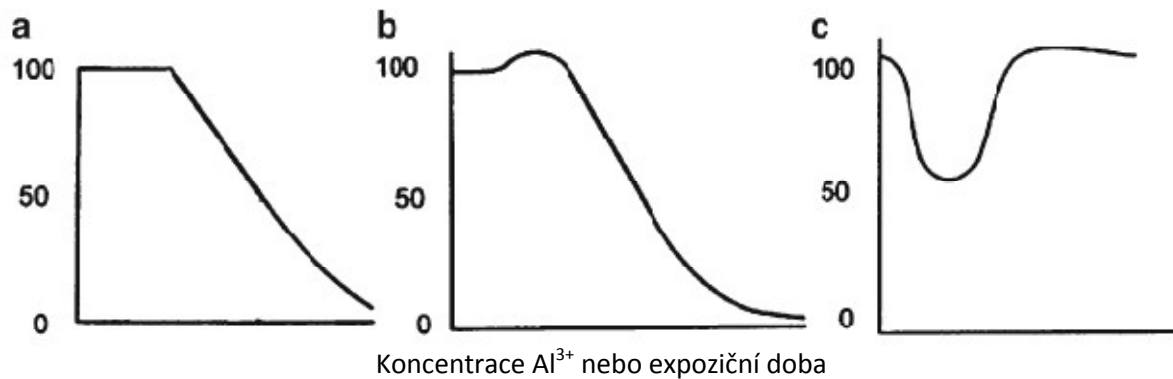


Převzato a upraveno dle Poschenrieder a kol. (2009)

Charakteristické rysy buněk v této zóně jsou nejpravděpodobněji zodpovědné za vnímání toxicity hliníku. V tranzientní zóně mají totiž buňky zvláštní architekturu, která je důležitá díky svojí výjimečné schopnosti vnímat faktory okolního životního prostředí, například vysoká citlivost na extracelulární vápník ( $\text{Ca}^{2+}$ ) (Baluska, Volkmann a Barlow 2001). Zastavení růstu kořenů je velmi rychlé, v rámci minut (30-120 minut po přidání  $\text{Al}^{3+}$ ) (Doncheva *et al.* 2005). Pro zastavení růstu kořenů stačí jen velmi nízké koncentrace toxického hliníku (mikromolární). Kořeny se prodlužují díky dělení buněk v apikálním meristému a jejich růstu v elongační zóně. Zatím všechny studie naznačují, že tak rychlé zastavení růstu je způsobeno spíše díky zastavení růstu buněk (jejich prodlužování), než jejich dělení (Barcelo a Poschenrieder 2002).

Buněčné dělení samo o sobě nezvyšuje délku kořene (ani rychlostí dělení buněk, ani časovým obdobím, kdy mitotické buňky zůstávají aktivní), avšak zastavení dělení buněk může ovlivnit růst kořene v dlouhodobějším měřítku (Barcelo a Poschenrieder 2002). Právě zastavení růstu kořenů je často využíváno v experimentech jako důkaz hliníkové toxicity a případné prokázání tolerance či rezistence rostlin na toxický hliník (zvláště v hydroponii), viz tabulka 1. Díky monitorování růstu kořenů u odrůd kukuřice při různé koncentraci  $\text{Al}^{3+}$  a po různě dlouhou dobu vystavení toxickému působení byly vypracovány, různé modely chování rostlin viz graf 1.

Graf 1 - Modely pro relativní odezvu prodloužení kořene (v %)



Převzato a upraveno dle Poschenrieder a kol. (2009)

**a) Model Hranice toxicity**, kde doba expozice (obvykle 15-45 min.) a prahová koncentrace (obvykle několika málo  $\mu\text{M}$ ) je nutná k  $\text{Al}^{3+}$ -indukované měřitelné inhibici elongace kořene. Tato hranice je indikátorem odolnosti rostlin vůči  $\text{Al}^{3+}$ .

**b) Model Hormeze** (horní meze), kdy se přechodně stimuluje elongace kořene a poté následuje inhibice růstu kořene. Hormeze je obecný efekt, kdy se díky toxickému faktoru (zde  $\text{Al}^{3+}$ ) a nastartování obrany organismu zmírní reakce na ostatní stresové faktory (např. odpověď na nízké pH).

**c) Model Prahové tolerance**, kdy nastává rychlá inhibice prodloužování kořene a následuje zpětné obnovení růstu. Tento model je pozorován u rostlin s indukovatelným mechanismem odolnosti k  $\text{Al}^{3+}$ , spočívajícím v například vylučování organických aniontů. V tomto případě je počáteční inhibice elongace kořene reverzibilní, k obnovení růstu dochází po aktivaci mechanismů vedoucích k odstranění navázaného toxického  $\text{Al}^{3+}$  z buněčných struktur, které byly zodpovědné za inhibici elongace. Ve skutečnosti, dokonce i u citlivých rostlin, můžeme tohoto efektu dosáhnout po přemístění rostlin do média bez hliníku.

Doba, která je nutná k úplnému zbavení se  $\text{Al}^{3+}$  a obnovení růstu kořene, se pohybuje mezi 15 a 120 min v závislosti na druhu rostliny a experimentálních podmínkách. Časnější obnovy růstu kořenů lze dosáhnout v roztoku obsahujícím organické kyseliny nebo vysoké koncentrace vápníku ( $\text{Ca}^{2+}$ ) (Barceló a Poschenrieder 2002, Poschenrieder a kol. 2009, Ma 2000).

## 4.2. Mechanismus toxicity hliníku

Bylo navrženo mnoho možných mechanismů a modelů zodpovědných za zastavení růstu kořenů, avšak jak přesně na zastavení růstu kořenů působí toxický hliník, se zatím nepodařilo rozluštit. Mechanismy jeho toxicity se mohou velmi lišit v závislosti na koncentraci  $\text{Al}^{3+}$  a době, po kterou je mu rostlina vystavena. Při krátkodobém působení nízkých koncentrací  $\text{Al}^{3+}$  (desítky mikromolů) může dojít jen k ovlivnění apoplastu kořenových buněk (buněčné stěny). Pokud je ale působeno koncentracemi milimolárními a po dlouhou dobu, může být ovlivněno mnoho funkcí a cílů v buňce, včetně DNA a enzymů, viz tabulka 1 (Ma *et al.* 2004).

Koncentrace toxického hliníku v kyselé půdě zřídka přesahuje 140 mikromolů, což znamená, že některé předchozí výsledky získané v laboratořích při milimolárních koncentracích  $\text{Al}^{3+}$  nebude možné aplikovat na přírodní podmínky (Ma 2007). Je také důležité mít stále na paměti, že celková koncentrace hliníku a koncentrace pro rostlinu volně přístupných toxických  $\text{Al}^{3+}$  se může významně lišit, a to vzhledem k tvorbě jeho komplexů s fosfáty již v půdě, na povrchu kořene (vazba na organické kyseliny malát a oxalát) nebo v buněčných stěnách (vazba na kyselé skupiny pektinů a hemicelulóz).

Toxický hliník může interagovat v kořenových buňkách s buněčnou stěnou, plazmatickou membránou a narušovat transport látek přes ni. Dále je známo, že může inhibovat aktivitu enzymů, DNA replikaci a dynamickou nestabilitu cytoskeletu, ovlivnit signální dráhy a homeostázi v cytoplazmě díky zvýšené koncentraci  $\text{Ca}^{2+}$ , způsobit dysfunkci mitochondrií a mnoho dalších věcí (Ma 2005). Klíčovým částem buňky a procesům ovlivněným hliníkem se budu věnovat níže.

### 4.2.1. Interakce toxického hliníku a buněčné stěny

Jedním z prvních míst kontaktu  $\text{Al}^{3+}$  s buňkou je buněčná stěna (apoplast). Dosud publikované studie ukazují, že největší množství toxického hliníku se váže právě tam, a to kolo 85 až 99% celkově navázaného hliníku v kořenech (Ma 2007). Primární vazebné místo pro  $\text{Al}^{3+}$  v buněčné stěně je pektinová matrix. Pektin se skládá hlavně z řetězců kyseliny galakturonové, které obsahují záporně nabitě karboxylové skupiny s vysokou afinitou k  $\text{Al}^{3+}$  (Matsumoto 2000). Ve skutečnosti je ale faktorem zodpovědným za vazbu  $\text{Al}^{3+}$  na pektin jeho záporný náboj určený mírou metylace pektinu, protože metylace snižuje množství záporně nabitých karboxylových skupin v pektinových molekulách (Eticha, Stass a Horst 2005). Methylace pektinu je prováděna enzymem pektin metyltransferázou ještě před jeho dopravou do buněčné stěny. V buněčné stěně dochází k de-methylaci pektinu pomocí enzymu pektin metylesterázou (Horst *et al.* 2010). Bylo prokázáno, že akumulace hliníku a senzitivita kultury buněk kukuřice na  $\text{Al}^{3+}$  je modulována metylací jejich buněčných stěn (Schmohl *et al.* 2000).

Krátké působení metylesterázou na intaktní kořeny kukuřice potvrdilo zvýšenou akumulaci hliníku v buněčných stěnách a urychlilo zastavení růstu kořenů (Schmohl a Horst 2000).

Zdá se, že množství toxického hliníku vázajícího se na pektinovou matrix pozitivně koreluje s  $Al^{3+}$  indukovanou syntézou kalózy, a tím s citlivostí kořenů rostlin na  $Al^{3+}$ . V ječmeni bylo také ukázáno, že v kořenech je celulózasyntéza inhibována ve prospěch kalózasyntézy (Horst *et al.* 2010). Role obsahu pektinu a akumulace  $Al^{3+}$  byla dále doložena díky přístupem, kdy byl měněn obsah pektinu v intaktních kořenech kukuřice a v buněčné kultuře kukuřice (Horst *et al.* 1999). Existují studie, které dokazují, že  $Al^{3+}$  svou vazbou na buněčnou stěnu ovlivňuje její vlastnosti, například elasticitu a viskozitu, které se mnohonásobně sniží. Je možné, že právě tento efekt  $Al^{3+}$  by mohl být klíčový v zastavení růstu buněk a tím i v růstu kořenů. Je také prokazatelné, že vinou navázaného  $Al^{3+}$  je buněčná stěna více náchylná k poškození a kořeny jsou vinou toho křehčí (Ma *et al.* 2004).

Toxický hliník také v buněčné stěně způsobuje změny v zastoupení polysacharidů, což bylo ukázáno na buněčných stěnách buněk kořenů pšenice, kdy v přítomnosti  $Al^{3+}$  vzrostlo množství pektinu a hemicelulózy, ale ne celulózy. Není ovšem známo, zda tento jev způsobuje sám  $Al^{3+}$  nebo je to výsledek zastavení růstu kořenů. Další látky, jejichž obsah ve stěně během toxického působení hliníku je zvýšen, jsou ferulové a diferulové kyseliny (Ma 2007). Během růstu buňky se buněčná stěna rozvolňuje, aby byl růst vůbec umožněn. Následně je nezbytné ukládat do ní další látky. Z tohoto důvodu jsou stávající polysacharidy ve stěně enzymaticky štěpeny a přestavovány, což ovšem vytváří další místa, kam se může  $Al^{3+}$  navázat a dále ovlivňovat plasticitu buněčné stěny (Ma *et al.* 2004). Působení toxického hliníku u jednoděložných a dvouděložných rostlin se nejvíce liší právě z hlediska jeho vazby do buněčných stěn vzhledem k rozdílnému složení buněčné stěny u těchto skupin rostlin (Horst *et al.* 2010).

Nedávná studie se zabývala tím, jak jednotlivé složky buněčné stěny (pektin, hemicelulóza 1 a hemicelulóza 2) absorbují toxický hliník a jak ten působí na xyloglukan endotransglukosylázovou-hydrolázovou aktivitu (aktivita tohoto enzymu spočívá v rozvolňování struktury buněčné stěny). Po 24h působení  $50 \mu M Al^{3+}$  na kořeny *Arabidopsis* se 75% hliníku v buněčné stěně váže na hemicelulózu 1. Zároveň bylo zjištěno, že toxický hliník již po 30 minutách působení značně snižuje xyloglukan endotransglukosylázovou-hydrolázovou aktivitu (což je zřejmě způsobeno transkripční regulací enzymu) a zároveň dochází k ukládání kalózy, což autoři považují za důležité v souvislosti se zastavením růstu kořenů (Yang *et al.* 2011a, Yang *et al.* 2011b). V další studii z tohoto roku se autoři zabývali funkcí hydroxyprolin bohatých glykoproteinů buněčné stěny v hliníkové toxicitě. Výsledky naznačují, že zvýšená akumulace hydroxyprolin bohatých glykoproteinů v buněčných stěnách, způsobená vlivem  $Al^{3+}$ , se podílí na zmírnění toxicity  $Al^{3+}$  v rýži (Pan *et al.* 2011).

### 4.2.2. Cytoplazmatická membrána

Cytoplazmatická membrána má na svém povrchu vzhledem k přítomnosti cholínu ve fosfolipidech záporný náboj, proto se na ni  $\text{Al}^{3+}$  váže a vytěsňuje ostatní kationty, jako například vápenaté ( $\text{Ca}^{2+}$ ), což má za následek změnu struktury, funkce a povrchového napětí membrány (depolarizace membrány). Nejvíce k těmto jevům dochází v distální přechodové zóně kořene.  $\text{Al}^{3+}$  se více než 500x silněji váže na cholín ve fosfatidylcholínu (lipidová složka membrány) než  $\text{Ca}^{2+}$  (Kochian, Pineros a Hoekenga 2005). Cytoplazmatická membrána po působení toxickým hliníkem je víc tuhá, dochází k peroxidaci lipidů a ke změně propustnosti, kdy se blokují vápníkové a draslíkové a kanály spolu s dalšími transportéry iontů (Ma 2007). Důležitou změnou je blokování  $\text{H}^+$  ATPasy, a tudíž zhroucení protonového gradientu. Transmembránový protonový gradient je hlavní hnací silou pro sekundární transport iontů,  $\text{Al}^{3+}$  tímto způsobem nepřímo ovlivňuje a mění iontovou homeostázu cytoplazmy v buňkách kořene (Kochian, Pineros a Hoekenga 2005, Ma 2007). Hliník též poškozuje hydraulickou vodivost plazmatické membrány a tonoplast kořenových buněk, což je důležitý prvek v růstu buněk. Význam tohoto toxického účinku  $\text{Al}^{3+}$  na hydraulickou vodivost se odráží v prominentní změně transkripce genu kódujícího aquaporin. Depolarizace membrány a výše popsané toxické účinky  $\text{Al}^{3+}$  se projevují takřka ihned, po kontaktu  $\text{Al}^{3+}$  s membránou (Sivaguru *et al.* 2005, Poschenrieder *et al.* 2008). Přesný sled akcí po signalizaci přítomnosti toxického hliníku na plasmatické membráně ještě není zcela známý.

Fyziologické studie ukazují, že toxický hliník zabraňuje transportu hořčíku do kořenových buněk a že aplikace hořečnatých iontů do média může zmírnit jeho toxicitu u rozličných druhů rostlin. Aktivita transportéru hořčíku na plazmatické membráně v *Arabidopsis thaliana* (AtMGT1) je inhibována relativně nízkými koncentracemi toxického hliníku. Hořčík je důležitou součástí chlorofylu a slouží jako kofaktor s ATP v mnoha enzymatických reakcích (např.: ATPázy a RNA polymerázy). Pokud je díky toxickému hliníku snížen transport hořčíku do buněk, dojde k jeho celkovému nedostatku, což může být jedna z příčin zabránění růstu rostlin. Toto je podpořeno faktem, že nadprodukcí transportérů hořčíku z *Arabidopsis* (AtMGT1) lze zmírnit toxicitu hliníku u tabáku (Ma 2007). Další transportér iontů, který toxický hliník ovlivňuje, je transportér draslíku. U sojových bobů vedla expozice toxického hliníku k rapidnímu poklesu  $\text{K}^+$  výdeje z buněk, beze změny jeho příjmu, což vedlo ke změně propustnosti a náboje cytoplazmatické membrány (Horst *et al.* 2010). V pšenici kde je reakcí na toxický hliník výdej malátu (organický aniont) z buněk byl náboj vyrovnán výdejem  $\text{K}^+$ . To bylo pozorováno i u kukuřice, kde toxickým hliníkem indukované uvolňování citrátu prostřednictvím aniontového kanálu bylo pozorováno bez negativního ovlivnění  $\text{K}^+$  výdeje či příjmu (Horst *et al.* 2010, Kollmeier *et al.* 2001, Horst 1995).

V cytoplazmatické membráně se dále nachází kalózasyntáza, membránový enzym jehož ovlivnění toxickým hliníkem je jedna z nejrychlejších fyziologických odpovědí na hliníkovou toxicitu. Kalóza je syntetizována membránově vázanou 1,3- $\beta$ -D-glukan syntetázou, která jako substrát používá UDP-glukózu. Tento enzym je spouštěn různými stresy, jako je zranění a těžké kovy. Kalóza může propojit sousední buněčné stěny a zamezovat jejich růstu, blokuje plasmodesmy a zastavuje symplastický proud roztoků. Během toxického působení hliníku dochází k aktivaci enzymu a ke vzrůstu ukládání kalózy, pozorovatelné již po pár minutách působení. Proto byla tato skutečnost již v několika studiích využita jako marker toxicity hliníku, viz tabulka 3. Ukládání kalózy je pozorováno v epidermální vrstvě obklopující kořenový vrchol a k její produkci dochází pouze v aktivně rostoucích částech kořene (Ma 2007). Dříve se mělo za to, že změna koncentrace vápníku v cytoplazmě vyvolaná působením  $Al^{3+}$ , je jediný spouštěcí mechanismus pro ukládání kalózy, ale nynější data tomu nenasvědčují. Experimentální zvýšení koncentrace vápníku v cytoplazmě způsobilo pouze její malý přírůstek. Předpokládá se, že ukládání kalózy není primárním mechanismem v zastavení elongace kořenů, ale spíše následným efektem toxického působení hliníku (Horst *et al.* 2010, Panda a Matsumoto 2007, Ma 2007).

### 4.2.3. Cytoplazma

Klasicky byla plazmatická membrána považována za nepropustnou pro trojmocné kationty. Předpokládalo se, že toxický hliník pronikne do cytoplazmy (symplastu) až po dlouhodobé expozici. Výsledky pokusů prokázaly, že rychlost transportu hliníku do cytoplazmy je 20 až 250  $pmol\ m^{-2}\ s^{-1}$ . Nicméně, i tyto pomalé rychlosti umožňují malému množství potenciálně toxickému hliníku vstoupit do cytoplazmy během několika minut (Poschenrieder a kol. 2009). Mechanismus a chemické specifikace, které mu umožňují, projít plazmatickou membránou jsou stále neznámé. Na základě výsledků s Al-tolerantním druhem (*Fagopyrum*) bylo postulováno, že iontový transport  $Al^{3+}$  je do cytoplazmy usnadněn pasivním mechanismem na základě příznivého elektrochemického gradientu, přičemž gradient je udržován díky okamžité chelataci příchozího  $Al^{3+}$  citrátem nebo oxalátem. Zatím ale nebyl nalezen daný transportér (Ma 2007). Membránový transport  $Al^{3+}$  prostřednictvím endocytózy do buňky je další možností ke zvažování toho, jakým způsobem a jak rychle se hliník do buňky dostane. (Panda 2010).

Internalizace hliníku do endosomálního / vakuolárního systému v buňkách distální tranzientní zóny kořenů *Arabidopsis* byla zviditelněna fluorescenční mikroskopií, ve vakuolách byl hliník zjištěn 3 hodiny po expozici, což znamená nutnost jeho dopravy přes tonoplast (membránu vakuol). U *Arabidopsis* lze chelatované  $Al^{3+}$  přepravovat přes tonoplast pomocí half-transportéru typu ABC (Poschenrieder a kol. 2009).



Vzhledem k nízké rychlosti transportu toxického hliníku přes plasmatickou membránu, a jeho uložení ve vakuolách, v kombinaci s povětšinou neutrálním pH v symplastu, lze očekávat, že volný a reaktivní  $Al^{3+}$  se v cytoplazmě skoro nenachází. Nicméně dokonce subnanomolární koncentrace  $Al^{3+}$  efektivně soutěží s hořčíkem (Mg) vazbou na ATP (Ma 2007). Ve skutečnosti je toxicita  $Al^{3+}$  v cytoplazmě do značné míry závislá na relativní afinitě  $Al^{3+}$  k jeho cílům a k ochranným ligandům, které jsou schopny ho detoxikovat. Mezi cíle  $Al^{3+}$  toxicity patří mimo jiné ATP, GTP, nukleové kyseliny, glutamát, endosomální transport a cytoskelet. Organické kyseliny, především citrát a oxalát, jsou organické ligandy, které mohou zabránit  $Al^{3+}$  ve vazbě na tyto cíle (Poschenrieder a kol. 2009). Jakékoli vysvětlení toxicity  $Al^{3+}$  v rostlinách se musí vypořádat se skutečností, že v kořenech je jen velmi malá oblast kde  $Al^{3+}$  opravdu působí nejvíce a to je distální část tranzientní (přechodové) zóny. Jinými slovy, musí být primární cíl být buď molekula, která se vyskytuje pouze v této velmi malé zóně, nebo proces, který je prováděn aktivně pouze v buňkách této oblasti kořene. Nedávné studie potvrzují vysokou míru endocytózy a endocytické váčkové recyklace v buňkách této zóny. Kromě toho, tyto buňky v sobě endocytózou akumulují  $Al^{3+}$  a ovlivňují tím všechny procesy spojené s tímto fenoménem, včetně aktinového cytoskeletu, produkce (NO, viz dále), polárního transportu auxinu a samozřejmě celou signalizací. Jen těžko říct, na co všechno  $Al^{3+}$  tímto způsobem působí (Panda 2010).

Zajímavé je, že toxický hliník ovlivňuje i mitochondrie. Při dlouhodobé reakci  $Al^{3+}$  tlumí dýchání a snižuje obsah ATP, ale i během časně expozice kolísá elektrochemický potenciál na vnitřní membráně mitochondrií a rychlost elektronového transportu se zpomaluje. V průběhu jeho expozice tedy mohou interagovat postižené mitochondriální funkce se sníženou hladinou cukru a vyvolat masivní produkci reaktivního kyslíku a nakonec i buněčnou smrt. Další studie na toto téma jsou rozhodně žádoucí (Abdel-Basset *et al.* 2010).

### Cytoskelet

Efekt toxického hliníku na cytoskelet rostlinných buněk byl mnohokrát zkoumán, ovlivňuje mikrotubuly i aktinová filamenta, které se mimo jiné významně podílejí na růstu buněk (Ma 2007). V elongační zóně kořene dochází k depolymeraci mikrotubulů a k rychlému rozpadu kortikálních mikrotubulů v tranzientní zóně kořene (Horst *et al.* 1999). Studie ukázaly, že krátké působení toxickým hliníkem v kultuře tabákových buněk vede k formaci dalších svazků kortikálních mikrotubulů, ale tloušťka jednotlivých svazků mikrotubulů klesá. Dlouhodobé vystavení hliníku působí ztrátu orientace kortikálních mikrotubulů. Tyto změny jsou velmi rychlé, postupně se dochází k předpokladu, že jeden z prvních cílů toxicity hliníku jsou právě mikrotubuly (Schwarzerova *et al.* 2002, Ma 2007).

Neméně jsou ovlivněna i aktinová filamenta, která reagují na toxický hliník výrazným zvyšováním svého počtu, přecházením do svazků, zvýšenou tuhostí svých vláken a v interfázi kořenových buněk *Triticum turgidum* dochází k jejich deorganizaci (Frantzios, Galatis a Apostolakos 2005). Avšak tyto změny týkající se cytoskeletu mohou být nepřímo a sekundárně způsobeny vzájemným provázáním buněčné stěny, cytoplazmatické membrány a právě cytoskeletu (Ma 2007). Důležité je že,  $Al^{3+}$  v cytoplazmě může znemožnit GTPásovou a ATPásovou aktivitu tubulinu a aktinu a také cytoskelet ovlivnit zvýšením cytosolického  $Ca^{2+}$  (Zheng S.J., Yang J.L. 2005).

#### 4.2.4. Signální dráhy

##### Fosfolipázy – PLC, PC-PLC a PLD

Velmi zajímavý a důležitý je fakt, že toxický hliník utlumuje inositol 1,4,5-trifosfátovou signální dráhu v pšenici. Bylo zjištěno, že krátká expozice (1h) toxického hliníku snižuje aktivitu fosfolipázy C (PLC) v kořenech pšenice, ale neovlivňuje aktivitu dalších enzymů této signální dráhy (Ramos-Diaz *et al.* 2007, Ma 2007). Fosfolipáza C hydrolyzuje fosfatidylinositol 4,5-bisfosfát ( $PIP_2$ ) a vytváří inositol 1,4,5-trifosfát ( $Ins [1,4,5]P_3$ ) v cytoplazmě a diacylglycerol (DAG) v membráně. Snížení produkce  $Ins (1,4,5)P_3$  může vést ke změně koncentrace cytoplazmatického vápníku v čase a prostoru, což ovlivní mnoho dalších signálních kaskád v buňce, jelikož cytoplazmatický  $Ca^{2+}$  je velmi důležitý druhý posel (Ma 2007). V kultuře buněk *Coffea arabica* bylo zjištěno, že toxický hliník potlačuje vytváření fosfatidových kyselin (PA), které se účastní signálních drah v odpovědi na mnoho stresových faktorů rostlin. Jelikož fosfatidové kyseliny jsou vytvářeny fosforylací z DAG, je jejich pokles přičítán utlumení činnosti PLC (Ramos-Diaz *et al.* 2007).

Nedávno bylo vyzkoumáno, že nový člen rostlinné fosfolipázové rodiny fosfatidylcholin-hydrolyzující fosfolipáza C (PC-PLC), taktéž reaguje na toxický hliník. V kultuře tabákových buněk BY-2 a v pylových láčkách byl po přidání  $AlCl_3$  pozorován rapidní úbytek diacylglycerolu (DAG) který vznikal z reakcí katalyzovaných právě PC-PLC. Zastavení růstu pylových láček díky  $AlCl_3$  se dalo zvrátit externím přidáním DAG (Pejchar *et al.* 2010).

Další výzkum působení  $Al^{3+}$  v kultuře tabákových buněk BY-2 v souvislosti s fosfolipázami a mikrotubuly ukázal, že  $Al^{3+}$  snižuje tvorbu fosfatidových kyselin *in vivo* a inhibuje aktivitu fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát dependentní fosfolipázy D *in vitro*. Ukázalo se, že dynamika mikrotubulů ovlivňuje produkci fosfatidových kyselin. Nicméně interakce hliníkových iontů s PLD a mikrotubuly se nedá vysvětlit jednoduše jen díky aktivaci PLD destabilizací mikrotubulů. Existuje zde pravděpodobně další regulační mechanismus, který je citlivý na toxický hliník. Pejchar a kolektiv došli k závěru, že cytoskelet a signální dráhy fosfolipidů spolupracují během reakce rostlin na stres způsobený toxickým hliníkem (Pejchar *et al.* 2008).

### Oxid dusnatý

Oxid dusnatý (NO) je důležitá signální molekula, která se účastní mnoha fyziologických procesů v rostlině. Nedávno bylo zjištěno, že toxický hliník inhibuje aktivitu syntázy oxidu dusnatého (NOS) a snižuje vnitřní koncentraci NO v *Hibiscus moscheutos*. Toto snižování NO velmi dobře koreluje u tohoto druhu rostliny se zastavením růstu kořenů. Zajímavé je, že snižování koncentrace NO v apikálních buňkách kořene nastává dříve, než zastavení růstu kořene, což naznačuje, že jeho snižování je spíše příčina, než následek hliníkové toxicity (Ma 2007).

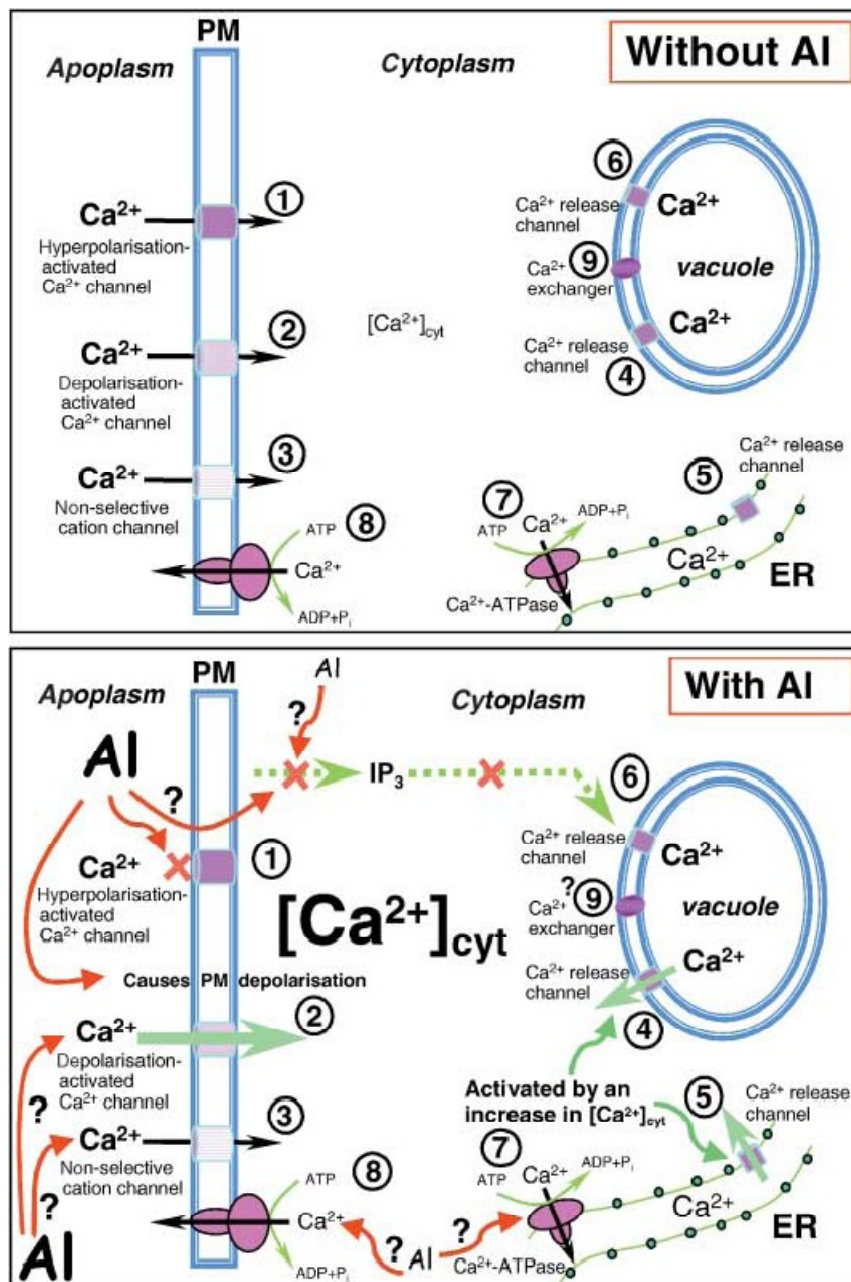
### Auxin

Jedno z důležitých zjištění poslední doby je to, že inhibice elongace kořene díky toxickému hliníku v *Arabidopsis thaliana* je možná zprostředkována ethylenem a auxinem.  $Al^{3+}$  indukovaná produkce etylenu v kořenové špičce pravděpodobně působí jako signál ke změně distribuce auxinu v kořenech a tím naruší AUX1 a PIN2 proteiny zprostředkovaný polární transport auxinu, což vede k zastavení elongace kořene (Sun *et al.* 2010). Mutantní rostliny *Arabidopsis* s narušenou produkcí ethylenu byly odolnější vůči  $Al^{3+}$  ve srovnání s kontrolní rostlinou. Tyto výsledky dle autorů zdůrazňují klíčovou roli, kterou hrají ETR1 a EIN2, dva klíčové proteiny ethylenové signalizace v hliníkové toxicitě. Indukce tvorby ethylenu, a následně díky tomu změna auxinové distribuce proběhla velmi rychle (Sun *et al.* 2010).

### Vápník

Ačkoliv toxický hliník utlumuje aktivitu hyperpolarizací aktivovaných  $Ca^{2+}$  kanálů na cytoplazmatické membráně, tak působí značný a okamžitý vzrůst cytosolického  $Ca^{2+}$  a jeho aktivity. Tento vzrůst je z větší části z mimobuněčných zdrojů, a to díky příjmu  $Ca^{2+}$  přes depolarizací aktivované  $Ca^{2+}$  kanály nebo přes neselektivní kationtové kanály v cytoplazmatické membráně. Zdrojem mohou být i vnitrobuněčné zdroje, kdy se  $Ca^{2+}$  dostává do cytoplasmy zvýšenou aktivitou  $Ca^{2+}$  propustných kanálů na tonoplastu a na membráně endoplazmatického retikula. Cytosolický vápník je důležitý druhý posel v signálních drahách buněk a narušení jeho homeostázy v cytoplazmě může negativně ovlivňovat mnoho biochemických a fyziologických procesů, mezi ně může patřit zastavení růstu kořenů, syntéza kalózy a dezorganizace cytoskeletu (Rengel a Zhang 2003, Ma 2007, Horst *et al.* 2010). Pro lepší přehled  $Ca^{2+}$  aktivity viz obrázek 2.

Obrázek 2 – Působení toxického hliníku na procesy spojené se zvýšením  $\text{Ca}^{2+}$  v cytoplasmě



Převzato a upraveno dle Rengel a Zhang (2003)

Hyperpolarizací aktivované  $\text{Ca}^{2+}$  kanály jsou inhibovány Al (1), zatímco depolarizace plasmatické membrány (PM) díky Al může zvýšit  $\text{Ca}^{2+}$  tok přes depolarizací aktivované  $\text{Ca}^{2+}$  kanály (2) (tyto kanály jsou jen částečně potlačeny Al díky absenci sodíku) (poznámka: tlustší šipky označují větší tok než tenké šipky). Domnělý vliv Al na  $\text{Ca}^{2+}$  neselektivní propustné kationtové kanály (3) je v současné době (2003) neznámý. Větší tok  $\text{Ca}^{2+}$  z apoplastu má za následek počáteční zvýšení  $\text{Ca}^{2+}$  v cytoplasmě, a tím aktivuje uvolnění  $\text{Ca}^{2+}$  z kanálů v tonoplastu (4) a endoplazmatickém retikulu (ER) (5), čímž se zvyšuje  $\text{Ca}^{2+}$  v cytoplasmě ještě dále. Al (buď extracelulární, nebo intracelulární) může blokovat  $\text{IP}_3$  formaci a zmírnit  $\text{IP}_3$  generování signálu pro aktivaci specifických propouštěcích  $\text{Ca}^{2+}$  kanálů v tonoplastu (6). Vliv Al na  $\text{Ca}^{2+}$  ATPázy nacházející se v endoplazmatickém retikulu (7) a v plasmatické membráně (8) je v současnosti nedostatečně zdokumentován, ale předběžné experimenty naznačují, že Al může inhibovat tato čerpadla, což by mělo za následek zvýšení  $\text{Ca}^{2+}$  v cytoplasmě. Potenciální účinky Al na  $\text{Ca}^{2+}$  výměníky (CAX) v tonoplastu (9) jsou neznámé.

#### **4.2.5. Oxidativní stres způsobený toxickým hliníkem**

Nadále zkoumaným jevem je to, že toxickým hliníkem indukované poškození membránových funkcí a zvýšení hladiny vápníku v cytoplazmě může souviset s posílením oxidativního stresu a okamžitým a trvalým vytvářením reaktivních forem kyslíku (ROS), což vede k peroxidaci lipidů a oxidaci proteinů (Horst *et al.* 2010, Ma 2007). Právě geny, které se spouštějí při oxidačním stresu, se při působení toxickým hliníkem aktivují (Ezaki *et al.* 2005, Horst *et al.* 2010). Nicméně oxidační stres v buňkách kořene pravděpodobně není primárním důvodem pro inhibici elongace kořene, protože ve většině případů byl jev pozorován pouze po dlouhodobém působení toxickým hliníkem (Yamamoto, Kobayashi a Matsumoto 2001, Horst *et al.* 2010). Právě nadprodukce mitochondriální manganové superoxid dismutázy a dalších antioxidačních enzymů jako glutathion S-transferázy a peroxidázy měla za následek částečné zvýšení odolnosti rostlin vůči toxickému hliníku (Ezaki *et al.* 2001, Ma 2007).

## 5. Resistance a tolerance rostlin vůči hliníku

Některé rostlinné druhy si vyvinuly mechanismy, které jim umožňují přežít v kyselé půdě lépe než ostatním. Tyto rostliny a jejich mechanismy jsou intenzivně zkoumány (nejdůležitější způsoby stanovení odolnosti rostlin jsou vyjmenovány v tabulce 1), neboť vzhledem k vysokému výskytu toxicity hliníku na zemědělských půdách je pěstování odolných kultivarů zřejmě klíčovým řešením pro zachování výnosů z těchto půd. Tyto mechanismy můžeme rozdělit na dvě hlavní strategie: mechanismy rezistence a mechanismy tolerance, ačkoli rozdíly mezi nimi se mohou vzájemně překrývat. Mechanismy rezistence brání hromadění  $Al^{3+}$  v symplastu kořenových buněk a minimalizují škodlivé interakce s plazmatickou membránou, buněčnou stěnou nebo jiným cílem v apoplastu. Tyto mechanismy se nejčastěji spoléhají na produkci kořenových exudátů. Mechanismy tolerance umožňují rostlině bezpečně uložit hliník v rostlině, jakmile vstoupí do symplastu. To se děje prostřednictvím chelatace hliníku v cytosolu a tvorbou neškodných komplexů, které je potom možno v rostlině transportovat a izolovat (Kochian, Hoekenga a Pineros 2004, Horst *et al.* 2010).

Ve srovnání dostupných literárních údajů a posouzení odpovědi rostlin na hliníkový stres brání veliké rozdíly v experimentálních podmínkách. Například existuje veliký rozptyl v používání iontových forem a koncentrací hliníku na velmi rozmanité druhy a kultivary rostlin. Vědecké práce také nejsou sjednoceny v používaném iontovém složení média nebo typu půdy. A jako neméně důležité se jeví i stáří používané rostliny a čas, po který je na ni hliníkem působeno (Poschenrieder *et al.* 2008). Kromě mechanismů rezistence a tolerance rostlin na Al stres se také uvažuje o dalších možnostech, které mohou rostliny využívat, aby se s hliníkovým stresem lépe vyrovnaly. Mezi tyto možnosti patří blíže neidentifikované úpravy buněčných stěn a cytoplazmatických membrán buněk kořene za účelem snížení vazby hliníku do daných struktur a nižší propustnosti hliníku do cytosolu buněk (Poschenrieder *et al.* 2008). Na druhou stranu je například u pohanky pozorována inaktivace (vysrážení) hliníku vazbou s fosforem (P) právě v buněčných stěnách buněk kořene, aby se předešlo výskytu hliníku v cytosolu buněk (Yang *et al.* 2011b). Zároveň však je fosfor důležitým prvkem pro vývoj rostlin a jeho vysrážení se s hliníkem v buněčných stěnách kořenových buněk může navozovat jeho nedostatek v rostlině, což vede k negativnímu ovlivnění rostliny, jak je popsáno výše (Ma 2007).

Mezi další možnosti obrany rostlin před hliníkovým stresem se počítá i rostlinami vyvolaná změna pH v okolí kořene (na vyšší pH) a tvorba hraničních buněk spolu se „slizovatostí“ kořene (Poschenrieder *et al.* 2008). Hraniční buňky jsou populace buněk v okolí kořenové špičky, které se od ní oddělily a hrají roli při její ochraně před biotickými a abiotickými stresy.

Právě vývojovými charakteristikami hraničních buněk kořenů a tvorbou slizu na kořenech se zabývali Cai a kolektiv (2011). Zkoumali jejich role v ochraně kořenových špiček u sazenic rýže, toxicita hliníku byla hodnocena u dvou kultivarů lišících se v toleranci k toxickému hliníku. Elongace kořene a životaschopnost hraničních buněk sloužily jako indikátory pro efekt toxického hliníku. Fyzické odstranění hraničních buněk z kořenových špiček mělo za následek mnohem závažnější inhibici elongace kořene a vyšší hliníkovou akumulaci v kořenových špičkách. Tyto účinky byly výraznější u Al-citlivého kultivaru rýže, než u Al-tolerantního. Relativní životaschopnost hraničních buněk klesá s rostoucí koncentrací toxického hliníku. Zachování funkčních hraničních buněk kořenové špičky a posílení jejich slizové sekrece se zdá být významné při zmírňování hliníkové toxicity a umožňuje vyloučení hliníku ze špičky kořene rýže (Cai *et al.* 2011, Ma 2007).

Zvláštností a málo prozkoumaným jevem je vysoká odolnost proti toxickému hliníku u některých druhů lesních dřevin, které jsou dobře přizpůsobeny acidifikačním procesům v jejich stanovištích. Důležitá je symbióza s ektomykorhizními houbami, která může dále posilovat odolnost vůči toxickému hliníku u lesních dřevin (Poschenrieder *et al.* 2008).

**Tabulka 1 - Způsoby testování toxicity a posuzování tolerance rostlin na Al<sup>3+</sup>**

Posuzovaná odpověď buněk/rostlin	Citlivost/Čas působení	Kontrolované jevy v rostlinách	Experimentální podmínky	Oblast aplikace
Relativní prodloužení kořene	Vysoká/Dlouze i krátce	Růst kořenů (sazenice)	P/VŽ	T,TT
Produkce kalózy	Vysoká/krátce	Poškození membrány kořenové špičky	P/VŽ	T,TT,HR
Vitalní barvení buněk	Vysoká/krátce	Poškození membrány kořenové špičky	VŽ	TT,ZV
Barvení Hematoxylinem	Vysoká/Dlouze i krátce	Al v buněčných stěnách kořenových špiček, mykorhiza	P/VŽ čerstvá voda	T,HR
Fluorescence morinu	Vysoká/Dlouze i krátce	Apoplastické a symplastické Al	VŽ	ZV,T
Fluorescence Lumogallionu	Vysoká/Dlouze i krátce	Apoplastické a symplastické Al, Al v mykorhize	P/VŽ	ZV,T
Přeživší rostliny	Středně/dlouho	Životaschopnost daného druhu rostliny	P	TT

Převzato a upraveno dle Poschenrieder *et al.* (2008)

**Vysvětlivky:**

P - půda

T - prověřování tolerance v pěstitelských programech

ŽR - živný roztok

ZV - základní výzkum

TT – test toxicity

## 5.1. Mechanismy rezistence

Mechanismy rezistence brání hromadění  $Al^{3+}$  v symplastu a minimalizují škodlivé interakce s plazmatickou membránou, buněčnou stěnou nebo jiným cílem v apoplastu. Zamezení přístupu fyto toxických forem hliníku na cílová místa v rostoucí kořenové špičce je zásadní pro přežití rostlin v půdě s toxickým hliníkem (Barcelo a Poschenrieder 2002). Mechanismy rezistence se spoléhají na kořenové exudáty (např. malát, citrát, oxalát), které váží a detoxikují ionty hliníku v apoplastu. Důležitý je též následný transport komplexů s hliníkem mimo buňku, export toxického hliníku ze symplastu nebo schopnost opravovat škody způsobené toxickým hliníkem v buněčné stěně. Vypouštění organických kyselin z kořenů se zdá být nejrozšířenější mechanismus obrany rostlin proti toxickému hliníku. Tento mechanismus můžeme najít u jednoděložných i dvouděložných rostlin (Ryan a Delhaize 2010). Lokalizovaná sekrece relativně malého množství těchto organických kyselin může být dostatečná k ochraně kořenové špičky (Poschenrieder *et al.* 2008). Většina z důležitých plodin pro nás (například pšenice, rýže, kukuřice a sója) se spoléhá v mechanismech rezistence na kořenové exudáty. Ale dokonce i tolerantní druhy rostlin si své citlivé kořenové špičky (hlavně tranzientní zónu kořene) musí chránit proti toxickým formám hliníku.

U některých druhů rostlin je jejich rezistentní odpověď na toxicitu hliníku ovládána jediným genem, který kóduje transportní protein pro vypouštění exudátů na plazmatické membráně buněk kořene rostlin, zatímco v jiných se jedná o několik genů. V pšenici (*Triticum aestivum*) je hlavní gen mechanismu rezistence rostlin proti toxickému hliníku *TaALMT1* (ALMT genová rodina „aluminium-activated malate transporter“), kdy z kořenů dochází k výtoku malátu jako chelatačního činidla pro toxický hliník (Ma 2007, Delhaize, Gruber a Ryan 2007). Podobné geny byly identifikovány i u jiných druhů rostlin. U ječmene je to gen *HvAACT1* (MATE genová rodina, „multidrug and toxic compound extrusion“), je zodpovědný za výtoku citrátu z kořenů rostlin. Také u čiroku lze najít MATE genovou rodinu. Pro oxalát a jeho výtoku z kořenů zatím nebyla nalezena žádná genová rodina, co ho řídí (Poschenrieder *et al.* 2008). Další druhy rostlin, geny které řídí jejich rezistenci a vypouštění organické anionty z kořenů viz tabulka 2.



**Tabulka 2 - Mechanismy rezistence - geny, které kontrolují transport organických aniontů z kořenů rostlin**

Druh	Gen	Indukce Al <sup>3+</sup>	Aktivace Al <sup>3+</sup>	Vypouštěné organické anionty
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtALMT1	Ano	Ano	Malát
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtMETE	Ano	Ano	Citrát
<i>Brassica napus</i>	BnALMT1-1 a 1-2	Ano	Ano	Malát
<i>Hordeum vulgare</i>	HvAACT1	Ne	Ano	Citrát
<i>Secale cereale</i>	ScALMTI-M39,1 a M39,2	Ano	Ano	Malát, citrát
<i>Sorghum bicolor</i>	SbMATE	Ano	Ano	Citrát
<i>Triticum aestivum</i>	TaALMT1	Ne	Ano	Malát
<i>Triticum aestivum</i>	TaMATE1	Ne	Ne	Citrát

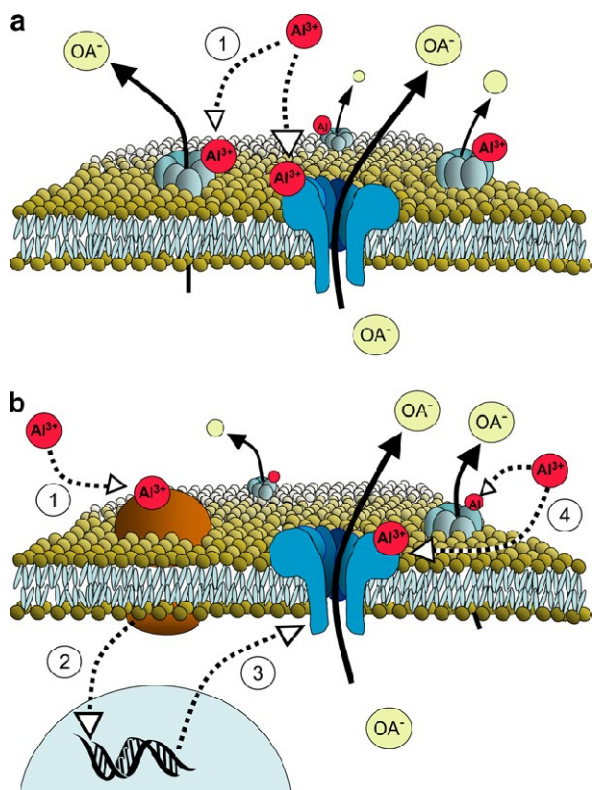
Převzato a upraveno dle Ryan a Delhaize (2010)

I jiné látky jako flavonoidní typy fenolů, různé fosfáty, proteiny a sekundární metabolity, které dokáží chelatovat toxický hliník, jsou při působení Al<sup>3+</sup> vypouštěné kořeny. Mezi kritéria, která z malátu a citrátu dělají ideální pomůcky rezistentního mechanismu, patří jejich schopnost tvořit stabilní a méně toxické komplexy s Al<sup>3+</sup> než je daný iont sám, častý výskyt v rostlinných buňkách, úsporná ekonomika jejich syntézy a to, že se můžou nespécificky transportovat skrz většinu rostlinných buněčných membrán (Delhaize *et al.* 2007).

Důvod pro přednostní výtok organických aniontů malátu a citrátu z kořenů je, že i při nízkém pH mají komplexy hliníku s citrátem nebo malátem vysokou stabilitu a že jejich syntéza v buňce je velmi jednoduchá a ekonomická. Tyto exudáty ale nejsou vypouštěny z kořenů neustále, většinou potřebují pro aktivaci svého výtoku toxický hliník (Ryan a Delhaize 2010). Zdaleka největší nárůst Al<sup>3+</sup> rezistence byl dosažen over-expresí transportních proteinů pro organické anionty. Nejvýraznější příklad byla over-exprese *TaALMT1* v ječmeni, pšenici a *Arabidopsis*. Tyto rostliny prokázaly větší relativní růst kořene 20, 8 a 4 násobně. Jak se ukázalo, pro zvýšení rezistence rostlin není ani tak důležitý metabolismus organických aniontů a jeho povzbuzení, jako spíš výskyt a množství jejich transportérů v kořenech (Ryan a Delhaize 2010).

Byly popsány dva vzory pro vypouštění organických aniontů z kořenů při kontaktu s toxickým hliníkem. Vzor I, kdy byl jejich výtok aktivován toxickým hliníkem téměř okamžitě, a vzor II, kdy prodleva mezi působením toxického hliníku a vypouštěním exudátů z kořenů trvala několik hodin (Poschenrieder a kol. 2009). Více viz obrázek 3.

Obrázek 3 - Hypotetické modely pro  $\text{Al}^{3+}$  aktivovaný výtok organických aniontů členy ALMT a MATE rodiny transportních proteinů.



Převzato a upraveno dle Delhaize *et al.* (2007)

(a) **Vzor I:** Transportní proteiny jsou vytvářeny konstitutivně v kořenové špičce,  $\text{Al}^{3+}$  rezistentní genotypy projevily větší expresi těchto proteinů než  $\text{Al}^{3+}$  citlivé genotypy rostlin.  $\text{Al}^{3+}$  (červené kroužky) aktivuje výtok organických aniontů ( $\text{OA}^-$ ) interakcí přímo s pre-existujícími bílkovinami transportních proteinů v plazmatické membráně (modře bílkoviny, šipka č.1). Tento model vysvětluje  $\text{Al}^{3+}$  aktivaci výtoku malátu přes *TaALMT1* v pšenici.

(b) **Vzor II:**  $\text{Al}^{3+}$  vyvolá nejdříve expresi proteinů pomocí signální dráhy (pravděpodobně zahrnující specifické receptory (šipky 1, 2 a 3)) nebo nesespecifické reakce na stres.  $\text{Al}^{3+}$  pak aktivuje výtok organických aniontů interakcí s nově syntetizovanými proteiny v plazmatické membráně (šipka 4). Tento model vysvětluje  $\text{Al}^{3+}$  aktivovaný výtok malátu přes *AtALMT1* u *Arabidopsis*, přes *BnALMT1* u *napus B.*, a také  $\text{Al}^{3+}$  aktivovaný výtok citrátu přes *AltSB* v čiroku.

V nedávné studii byly zkoumány účinky toxického hliníku na metabolismus organických kyselin a malátový výtok z kořenů pšenice. Byl zkoumán tolerantní a citlivý druh pšenice k hliníku.  $\text{Al}^{3+}$  snížil celkovou koncentraci malátu v kořenech u obou kultivarů.  $\text{Al}$ -citlivé odrůdy měly vyšší koncentraci malátu v kořenech, bez ohledu na přítomnost toxického hliníku. Proto se předpokládá, že pokles malátu v kořenech pod působením  $\text{Al}^{3+}$  nevyplývá z poklesu syntézy malátu, ale z nárůstu jeho rozkladu. Tato odpověď byla interpretována jako výsledek hliníkem vyvolaného stresu a ne jako příčina rozdílu mezi druhy pšenice.  $\text{Al}$ -tolerantní druh pšenice vylučoval více malátu z kořenů při působení hliníkem, což je ale nezávislé na jeho vnitřní koncentraci malátu v kořenech (de Andrade *et al.* 2011).

Rostliny se s toxickým hliníkem v kyselé půdě dostávaly a dostávají do kontaktu velmi často, proto u nich došlo k vývoji mechanismů rezistence, které můžeme pozorovat. Vznik  $Al^{3+}$  rezistence u rostlin se zdá být klasický příklad konvergentní evoluce. To je založeno na zjištění, že stejný mechanismus  $Al^{3+}$  rezistence působící u různých rostlin je kódován odlišnými genovými rodinami. Mechanismus  $Al^{3+}$  rezistence na bázi organických aniontů a jejich uvolňování z kořenových buněk se vyvinul poměrně nedávno, z mutací transportních proteinů pro organické anionty, které měly jiné místo nebo jinou funkci v rostlině. Mezi mnoha proteiny na přepravu organických aniontů přes rostlinné buněčné membrány se nejvhodnější pro převzetí role v  $Al^{3+}$  rezistenci zdají být členové MATE a ALMT rodiny (Delhaize *et al.* 2007). To, proč některé rostliny vypouštějí ze svých kořenů malát a jiné citrát, nezávisí ani tolik na množství a biochemii daných látek v kořenových buňkách, ale spíše na tom, jaký jejich transportér byl přítomen v rostlině, mutován a využit nejdříve na jejich transport ven z kořenů. Je také možné, že exprese genů zahrnutých v odpovědi na toxický hliník existovala již dříve, ale byla spouštěna jiným stresem, což vychází z poznatků, že se jejich exprese zvyšuje nejen při působení hliníku ale i při snížení pH média, přítomnosti jiného iontu kovu nebo nedostatku živin (P, Fe) (Ryan a Delhaize 2010).

Naše pochopení mechanismů rezistence postupuje rychleji než pochopení tolerančních mechanismů, protože mechanismy rezistence se vyskytují u mnoha plodin, které jsou pro nás důležité a je žádoucí u nich rezistenci zvýšit (pšenice, čirok, kukuřice, sója, ječmen) a také u dobře známých modelových druhů rostlin (*Arabidopsis* a rýže). Právě na těchto rostlinách se nejčastěji provádí výzkum mechanismů rezistence. Důležité je zde to, že nejčastěji jeden nebo dva geny vysvětlují většinu fenotypové variace ve smyslu Al-resistence uvnitř těchto druhů. Což znamená, že tyto geny kódují membránový transportní protein pro organické anionty a rostliny se liší především v tom, jestli vypouštějí ze svých kořenů malát, citrát nebo oxalát (Ryan a Delhaize 2010). U pšenice je zajímavé, že jediný gen (kódující transportní protein pro výdej malátu z membrány buněk kořenů) vysvětluje většinu změn v rezistenci u různých kultivarů pšenice, což vedlo k závěru, že schopnost rezistence k hliníku nebyla původním stavem tohoto druhu, ale objevila se až v poslední době v jeho vývoji. Rezistence v pšenici se zdá být spíše výjimkou než pravidlem, jelikož žádná podstatná rezistence na hliník nebyla zjištěna u tetraploidního předka hexaploidní pšenice a nedávno byla zjištěna pouze malá rezistence na hliník u diploidního předka hexaploidní pšenice (Ryan a Delhaize 2010, Ryan *et al.* 2010).

V souhrnu,  $Al^{3+}$  toxicita je jedním z hlavních selekčních tlaků na evoluci rostlin a mnohé druhy si vyvinuly mechanismy rezistence a tolerance ke zlepšení jejich přežití. Některé rostliny používají jen jeden typ mechanismu (pšenice a ječmen) ale jiné využívají mechanismy rezistence i tolerance, které se mohou počítat. *Arabidopsis* má oba odlišné mechanismy (Ryan a Delhaize 2010, Ryan *et al.* 2010).

### *Rýže jako modelový organismus pro výzkum rezistence*

Rýže a *Arabidopsis* jsou atraktivní systémy pro mutační analýzy jako modelové druhy. Rýže je důležitá plodina na celém světě s vysokou bazální úrovní odolnosti proti toxickému hliníku v porovnání s jinými obilovinami. Nápadné podobnosti mezi geny rezistence (kódující transportní proteiny pro organické anionty vypouštěné z kořenů jako chelatační činidla hliníku) izolovaných z rýže a *Arabidopsis* jsou zajímavé, neboť rýže je značně odolnější než *Arabidopsis*. Na rozdíl od jiných obilovin,  $Al^{3+}$  rezistence u ní nejde vysvětlit pouze výtokem organických aniontů, jelikož odtok citrátu z kořenů rýže je značně nižší než například u hliníkově citlivějšího žita, kde citrát představuje hlavní mechanismus rezistence (Ryan *et al.* 2011).

Nedávného průlomu v odhalení molekulárního základu rezistence rýže bylo dosaženo, když byl nalezen gen s názvem *OsSTAR1*, který kóduje protein s doménou bakteriálního typu ABC-transportéru. *OsSTAR1* protein interaguje s *OsSTAR2* proteinem který má transmembránovou doménu od stejné ABC-transportérové rodiny. Oba *OsSTAR1* a *OsSTAR2* proteiny jsou převážně exprimovány v kořenech a exprese obou je specificky vyvolána expozicí  $Al^{3+}$ . *OsSTAR* proteiny mohou transportovat UDP-glukózu do apoplastu exocytózou, ale přesný mechanismus jejich působení a souvislost s rezistencí vůči hliníku není znám. Předpokládá se, že tyto proteiny lokalizované v plazmatické membráně všech buněk kořene souvisí s vylučováním hliníku z buněk mimo kořen. Je také možné, že *OsSTAR* proteiny poskytují  $Al^{3+}$  'toleranci' spíše než 'rezistenci' tím, že vykonávají další funkce v cytosolu (Ryan *et al.* 2011, Ma 2007).

## 5.2. Mechanismy tolerance

Mechanismy tolerance jsou běžné u druhů v regiorech s kyselými půdami (např. tropy), kde schopnost vyrovnat se s  $Al^{3+}$  stresem je základním předpokladem pro přežití. (Ma, Ryan a Delhaize 2001). Tolerantní druhy rostlin (jinými slovy „akumulátoři toxického hliníku“) snesou vysokou koncentraci tohoto kovu ve svých pletivech, protože váží toxický hliník uvnitř buňky v jeho méně toxické formě. Základními ligandy pro detoxikaci hliníku v buňce jsou citrát (v pohance), oxalát (pohanka a *Melastoma*), nebo katechin (v čaji) (Barceló a Poschenrieder 2002, Ma 2007). Doprava komplexů s hliníkem xylémem do listů u pohanky probíhá pravděpodobně ve formě hliník-citrát (Ma 2007). Akumulovaný hliník v listech se vyskytuje v buněčných stěnách nebo vakuolách. Ko-depozice hliníku s křemíkem byla pozorována v jehlicích jehličnanů (Poschenrieder *et al.* 2008).

Mnoho rostlinných akumulátorů hliníku se vyznačuje trvale vysokým obsahem organických kyselin a i vysokým obsahem flavonoidů ve svých buňkách (Barceló a Poschenrieder, 2002). Také druhy schopné hyperakumulace těžkých kovů jako Zn, Cd, nebo Ni jsou charakterizovány konstitutivně vysokým obsahem organických kyselin. Tyto vysoké koncentrace potenciálních ligandů kovů mohou být předpokladem pro akumulaci kovů. Nicméně, samotná vysoká koncentrace organických kyselin a flavonoidů nestačí, jsou potřeba i transportní systémy pro transport komplexů s hliníkem přes tonoplast do vakuol nebo ven z buňky (Poschenrieder *et al.* 2008).

U *Arabidopsis* se byl objeven důležitý gen (*ALS1*) kódující protein half-ABC transportéru, který se nachází v tonoplastu, což by mohlo být důležité pro přepravu chelatovaného hliníku do vakuol. Dále bylo objeveno, že ve floému je v plazmatické membráně transportér, který je indukovatelný hliníkem a odstraňuje potenciálně toxický hliník z citlivých částí kořene. Také v rýži byl objeven gen, kódující protein (*Als1*), který se nejspíše účastní výtoku hliníku z kořenů. Nachází se v cytoplazmatické membráně buněk kořenové špičky (Poschenrieder a kol. 2009).

Příklady botanických rodin vyznačující se zvýšenou tolerancí k vysokým koncentracím toxického hliníku v pletivech jsou: *Melastomataceae*, *Polygonaceae*, *Theaceae*, *Caesalpinaceae*, *Rubiaceae* a *Hydrangeaceae* (Barcelo a Poschenrieder 2002). Pouze několik rostlin z těchto akumulátorů toxického hliníku je pěstováno pro lidskou spotřebu, např. pohanka (*Fagopyrum esculentum*, *Polygonaceae*) a čaj (*Comellia sinensis*, *Theaceae*), rostliny *Hydrangea spp.* jsou pěstovány jako okrasné.

### 5.3. Působení boru a křemíku v odolnosti vůči toxickému hliníku

Jeden z důležitých poznatků je, že výživa křemíkem (Si) zvyšuje odolnost rostlin vůči toxickému hliníku. Mechanismus tohoto jevu však ještě není celkově pochopen. Působení toxickým hliníkem na buňky kořene velmi zvyšuje akumulaci Si v buněčné stěně, což snižuje mobilitu apoplastického hliníku. Dospělo se k závěru, že Si vede k vytvoření hydroxyaluminiových silikátů (HAS) v apoplastu v kořenové špičce kořene, čímž dochází k detoxifikaci hliníku.

Bor (B) je klíčový konstrukční prvek v rostlinných pletivech, zejména v buněčných stěnách. To, že bor vylepšuje odolnost vůči toxicitě hliníku, bylo hlášeno u řady druhů rostlin. Nicméně, mechanismus odpovědný za zlepšení toxicity hliníku není zcela jasný. Důležité mohou být s borem související změny ve vlastnostech buněčné stěny. Jeho nedostatek zvyšuje obsah nemethylovaného pektinu, který vytvoří další vazebná místa pro hliník v buněčné stěně, čímž se zvyšuje jeho akumulace a toxicita. Doplnění boru do média snížilo vychytávání hliníku u hrachu (*Pisum sativum*) na kořenových špičkách a vazbu hliníku na buněčné stěny, což vyústilo v jeho menší toxicitu. Jiným studiím se však nepodařilo najít žádné zlepšující účinky boru na hliníkovou toxicitu. Obecně platí, že dvouděložné mají silnější reakci na přítomnost boru než jednoděložné, což může být způsobeno vyšším požadavkem dvouděložných na příjem boru (Horst *et al.* 2010).

## 6. Rostliny akumulující hliník a vyžadující hliník pro dobrý růst

Při studiu toxicity hliníku bylo mimo jiné zjištěno, že při určitých podmínkách a určitým rostlinám je toxický hliník spíše podporou v růstu a vývoji než naopak. Jedná se např. o čaj, kdy se po přidání  $\text{Al}^{3+}$  do média (0,5 mM při pH 4,3) elongace kořenů zvýšila 2,5 krát (Ghanati, Morita a Yokota 2005). U rostliny *Quercus serrata* se při stejné koncentraci  $\text{Al}^{3+}$  a pH 3,5 zvýšila celková biomasa kořenů (Ma 2007) a u rostliny *Melastoma*  $\text{Al}^{3+}$  zvýšil aktivitu kořenů a stimuloval prodlužování buněk (Watanabe, Jansen a Osaki 2005). Jak přesně  $\text{Al}^{3+}$  způsobuje tyto efekty není známo. Dřívější teorie předpokládaly, že toxický hliník zmírňuje protonový ( $\text{H}^+$ ) stres v kořenech při nízkém pH a že zlepšuje přísun fosforu (P) do kořenů, hypotézy byly později vyvráceny (Ma 2007). Nyní se má za to, že hliník zvyšuje aktivitu superoxidu dismutázy (SOD), katalázy (CAT) a askorbát peroxidázy (APX). Jde o antioxidanty, které mohou způsobovat vzrůst integrity membrány, opožďovat lignifikaci a zabraňovat rychlému stárnutí rostliny. Díky antioxidantům a jejich působení je potom stimulován rychlejší a delší růst kořenů (Ghanati *et al.* 2005). U rostliny *Melastoma* hliník dále zřejmě zmírňuje toxicitu železa (Fe), které se též často vyskytuje v kyselých půdách. Železo způsobuje v rostlině zvýšení produkce reaktivních kyslíkových radikálů a ty vedou k poruchám důležitých procesů v rostlině. Pokud se v růstovém médiu vyskytoval hliník i železo, docházelo k většímu prodlužování kořenů a koncentrace železa v kořenech poklesla (Ma 2007).

Nedávný výzkum rostlin čaje, které jsou nejčastěji pěstovány v kyselých půdách v horských oblastech a jejichž růst může být závislý na toxickém hliníku, přinesl zajímavé výsledky. Čajové rostliny byly pěstovány v živném roztoku s obsahem 1,5 a 2,5 mmol  $\text{L}^{-1}$  Al, a tato koncentrace hliníku způsobila větší růst nových pupenů a kořenů. Hliník stimuloval příjem Ca, Mg, K a Mn, vychytávání Fe, Cu a Zn bylo ztížené. Navíc celková koncentrace fenolu ve tkáních čajovníku rostla s rostoucí koncentrací hliníku. Obecně platí, že katechinová koncentrace v listech se zvyšuje s rostoucí koncentrací hliníku v hydroponických pokusech. Koncentrace hliníku v čajových rostlinách skutečně zvyšuje katechinovou koncentraci a hraje důležitou roli v růstu čajových rostlin (Chen *et al.* 2011).

## 7. Závěr

Do roku 2050 se světová populace lidí rozroste o dvě miliardy. Rostlinnou výrobu bude potřeba zvýšit o 50% nebo jinak vyhovět zvýšené poptávce po potravinách, krmivu pro zvířata a rostlinných vláknecích. Jedním z řešení je zlepšení výnosů již obdělávané půdy a též další půdy, dříve považovanou za nevhodnou pro zemědělství, bude třeba kultivovat. Kyselé půdy s výskytem toxického hliníku se vyskytují právě v regionech, kde se předpokládá největší přírůstek obyvatelstva (sub-saharská Afrika, Asie). Použití uhličitanu vápenatého je neúčinnější způsob jak zlepšit kyselost půdy a vyhnout se toxickému efektu hliníku a ostatnímu stresu s kyselostí půdy spojenému, jeho použití ale často není účelné. Je tudíž nutno zapojit i další mechanismy pro zlepšení kvality a výnosnosti půdy (Ryan *et al.* 2011).

Jako nejvhodnější a výhledově nejužitečnější se jeví plné pochopení toxicity hliníku a odpovědi rostlin na něj. Na poli výzkumu bylo učiněno v posledních letech mnoho objevů, které se především týkaly pochopení rezistence rostlin a vypouštění organických aniontů z kořenů. Dále bylo také objeveno několik set genů zapojených do odpovědi na toxický hliník (většina z nich čeká na plné pochopení jejich funkce). V celkovém pochopení mechanismu toxicity hliníku je však pokrok spíše malý (Horst *et al.* 2010). Toxické účinky hliníku lze přitom sledovat již během několika minut po působení na kořeny. Nejzásadnější účinek hliníkové toxicity je zastavení prodlužování kořene, dále dochází k akumulaci kalózy, poškození cytoskeletu, změnám v buněčné stěně i cytoplazmatické membráně, změnám povrchového náboje cytoplazmatické membrány a narušení vnitřní buněčné homeostáze včetně četných signálních drah, atd. Lze tedy říci, že toxický hliník působí na mnoho rozmanitých fyziologických i biochemických dějů, z nichž většina je na své primární úrovni způsobena vázáním hliníku na extracelulární a intracelulární látky kořene. Protože je zřejmě velmi těžké identifikovat primární mechanismus hliníkové toxicity, Ryan a kol. (2011) přišli s návrhem, že zastavení růstu kořenů je primárně způsobeno odpovědí rostliny na hliníkový stres, a ne hliníkem samotným, jak se dosud předpokládalo (Ryan *et al.* 2011).

Neměli bychom se bát ani transgenních strategií ve vyšlechtění co nejdolnějších rostlin na toxický hliník a zároveň bychom ale naše snažení neměli zaměřit jen jedním směrem k nejužitečnějším plodinám. I výzkum reakcí stromů a méně známých a významných rostlin na toxický hliník by měl patřit k našim cílům. Dle mého názoru je třeba sjednotit používané techniky výzkumu, interpretovat výsledky získané mnohdy zcela odlišným postupem a tím ucelit naše „vědění“. Teprve tehdy se díky vědomostem bude možné pustit do dalšího boje, abychom konečně po dlouhých letech mohli říci, že toxicita hliníku už je z větší části pochopena.



## **Seznam použité literatury**

- Abdel-Basset, R., S. Ozuka, T. Demiral, T. Furuichi, I. Sawatani, T. I. Baskin, H. Matsumoto & Y. Yamamoto (2010) Aluminium reduces sugar uptake in tobacco cell cultures: a potential cause of inhibited elongation but not of toxicity. *Journal of Experimental Botany*, 61, 1597-1610.
- Baluska, F., D. Volkmann & P. W. Barlow (2001) A polarity crossroad in the transition growth zone of maize root apices: Cytoskeletal and developmental implications. *Journal of Plant Growth Regulation*, 20, 170-181.
- Barabasz, W., D. Albinska, M. Jaskowska & J. Lipiec (2002) Ecotoxicology of aluminium. *Polish Journal of Environmental Studies*, 11, 199-203.
- Barcelo, J. & C. Poschenrieder (2002) Fast root growth responses, root exudates, and internal detoxification as clues to the mechanisms of aluminium toxicity and resistance: a review. *Environmental and Experimental Botany*, 48, 75-92.
- Cai, M. Z., S. N. Zhang, C. H. Xing, F. M. Wang, N. Wang & L. Zhu (2011) Developmental characteristics and aluminum resistance of root border cells in rice seedlings. *Plant Science*, 180, 702-708.
- Chen, Y. M., T. M. Tsao, C. C. Liu, K. C. Lin & M. K. Wang (2011) Aluminium and nutrients induce changes in the profiles of phenolic substances in tea plants (*Camellia sinensis* CV TTES, No. 12 (TTE)). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91, 1111-1117.
- de Andrade, L. R. M., M. Ikeda, L. I. V. do Amaral & J. Ishizuka (2011) Organic acid metabolism and root excretion of malate in wheat cultivars under aluminium stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49, 55-60.
- Delhaize, E., B. D. Gruber & P. R. Ryan (2007) The roles of organic anion permeases in aluminium resistance and mineral nutrition. *Febs Letters*, 581, 2255-2262.
- Delhaize, E. & P. R. Ryan (1995) ALUMINUM TOXICITY AND TOLERANCE IN PLANTS. *Plant Physiology*, 107, 315-321.
- Doncheva, S., M. Amenos, C. Poschenrieder & J. Barcelo (2005) Root cell patterning: a primary target for aluminium toxicity in maize. *Journal of Experimental Botany*, 56, 1213-1220.
- Eticha, D., A. Stass & W. J. Horst (2005a) Localization of aluminium in the maize root apex: can morin detect cell wall-bound aluminium? *Journal of Experimental Botany*, 56, 1351-1357.
- Eticha, D., C. The, C. Welcker, L. Narro, A. Stass & W. J. Horst (2005b) Aluminium-induced callose formation in root apices: inheritance and selection trait for adaptation of tropical maize to acid soils. *Field Crops Research*, 93, 252-263.
- Ezaki, B., M. Katsuhara, M. Kawamura & H. Matsumoto (2001) Different mechanisms of four aluminum (Al)-resistant transgenes for Al toxicity in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 127, 918-927.
- Ezaki, B., K. Sasaki, H. Matsumoto & S. Nakashima (2005) Functions of two genes in aluminium (Al) stress resistance: repression of oxidative damage by the AtBCB gene and promotion of efflux of Al ions by the NtGDI1 gene. *Journal of Experimental Botany*, 56, 2661-2671.
- Frantzios, G., B. Galatis & P. Apostolakos (2005) Aluminium causes variable responses in actin filament cytoskeleton of the root tip cells of *Triticum turgidum*. *Protoplasma*, 225, 129-140.
- Ghanati, F., A. Morita & H. Yokota (2005) Effects of aluminum on the growth of tea plant and activation of antioxidant system. *Plant and Soil*, 276, 133-141.
- Horst, W. J. (1995) THE ROLE OF THE APOPLAST IN ALUMINUM TOXICITY AND RESISTANCE OF HIGHER-PLANTS - A REVIEW. *Zeitschrift Fur Pflanzenernahrung Und Bodenkunde*, 158, 419-428.
- Horst, W. J., N. Schmohl, M. Kollmeier, F. Baluska & M. Sivaguru (1999) Does aluminium affect root growth of maize through interaction with the cell wall - plasma membrane - cytoskeleton continuum? *Plant and Soil*, 215, 163-174.

- Horst, W. J., Y. X. Wang & D. Eticha (2010) The role of the root apoplast in aluminium-induced inhibition of root elongation and in aluminium resistance of plants: a review. *Annals of Botany*, 106, 185-197.
- Kinraide, T. B., P. R. Ryan & L. V. Kochian (1992) INTERACTIVE EFFECTS OF AL-3+, H+, AND OTHER CATIONS ON ROOT ELONGATION CONSIDERED IN TERMS OF CELL-SURFACE ELECTRICAL POTENTIAL. *Plant Physiology*, 99, 1461-1468.
- Kochian, L. V. (1995) CELLULAR MECHANISMS OF ALUMINUM TOXICITY AND RESISTANCE IN PLANTS. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 46, 237-260.
- Kochian, L. V., O. A. Hoekenga & M. A. Pineros (2004) How do crop plants tolerate acid soils? - Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. *Annual Review of Plant Biology*, 55, 459-493.
- Kochian, L. V., M. A. Pineros & O. A. Hoekenga (2005) The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity. *Plant and Soil*, 274, 175-195.
- Kollmeier, M., P. Dietrich, C. S. Bauer, W. J. Horst & R. Hedrich (2001) Aluminum activates a citrate-permeable anion channel in the aluminum-sensitive zone of the maize root apex. A comparison between an aluminum-sensitive and an aluminum-resistant cultivar. *Plant Physiology*, 126, 397-410.
- Ma, J. F. (2000) Role of organic acids in detoxification of aluminum in higher plants. *Plant and Cell Physiology*, 41, 383-390.
- (2005a) Physiological mechanisms of Al resistance in higher plants. *Soil Science and Plant Nutrition*, 51, 609-612.
- (2005b) Plant root responses to three abundant soil minerals: Silicon, aluminum and iron. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 24, 267-281.
- . 2007. Syndrome of aluminum toxicity and diversity of aluminum resistance in higher plants. In *Survey of Cell Biology*, 225-+.
- Ma, J. F., P. R. Ryan & E. Delhaize (2001) Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends in Plant Science*, 6, 273-278.
- Ma, J. F., R. F. Shen, S. Nagao & E. Tanimoto (2004) Aluminum targets elongating cells by reducing cell wall extensibility in wheat roots. *Plant and Cell Physiology*, 45, 583-589.
- Matsumoto Hideaki (2000) Cell Biology of Aluminium Toxicity and Tolerance in Higher Plants *International Review of cytology*, Vol. 200 0074-7696/00
- Mossor-Pietraszewska, T. (2001) Effect of aluminium on plant growth and metabolism. *Acta Biochimica Polonica*, 48, 673-686.
- Pan, W. H., J. X. Shou, X. R. Zhou, X. J. Zha, T. R. Guo, M. Y. Zhu & J. W. Pan (2011) Al-induced cell wall hydroxyproline-rich glycoprotein accumulation is involved in alleviating Al toxicity in rice. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33, 601-608.
- Panda, S. K. & H. Matsumoto (2007) Molecular physiology of aluminum toxicity and tolerance in plants. *Botanical Review*, 73, 326-347.
- Pejchar, P., R. Pleskot, K. Schwarzerova, J. Martinec, O. Valentova & Z. Novotna (2008) Aluminum ions inhibit phospholipase D in a microtubule-dependent manner. *Cell Biology International*, 32, 554-556.
- Pejchar, P., M. Potocky, Z. Novotna, S. Veselkova, D. Kocourkova, O. Valentova, K. Schwarzerova & J. Martinec (2010) Aluminium ions inhibit the formation of diacylglycerol generated by phosphatidylcholine-hydrolysing phospholipase C in tobacco cells. *New Phytologist*, 188, 150-160.
- Poschenrieder, C., B. Gunse, I. Corrales & J. Barcelo (2008) A glance into aluminum toxicity and resistance in plants. *Science of the Total Environment*, 400, 356-368.
- Poschenrieder Charlotte a kol.(2009) Root Behavior in Response to Aluminum Toxicity *Plant-Environment Interactions* 10.1007/978-3-540-89230-4\_2
- Ramos-Diaz, A., L. Brito-Argaez, T. Munnik & S. M. T. Hernandez-Sotomayor (2007) Aluminum inhibits phosphatidic acid formation by blocking the phospholipase C pathway. *Planta*, 225, 393-401.

- Rangel A.F., Rao I., Horst W.J. (2007) Spatial aluminium sensitivity of root apices of two common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes with contrasting aluminium tolerance. *J Exp Bot* 58 : 3859 – 3904
- Rengel, Z. & W. H. Zhang (2003) Role of dynamics of intracellular calcium in aluminium-toxicity syndrome. *New Phytologist*, 159, 295-314.
- Rout, G. R., S. Samantaray & P. Das (2001) Aluminium toxicity in plants: a review. *Agronomie*, 21, 3-21.
- Ryan, P. R. & E. Delhaize (2010) The convergent evolution of aluminium resistance in plants exploits a convenient currency. *Functional Plant Biology*, 37, 275-284.
- Ryan, P. R., H. Raman, S. Gupta, T. Sasaki, Y. Yamamoto & E. Delhaize (2010) The multiple origins of aluminium resistance in hexaploid wheat include *Aegilops tauschii* and more recent cis mutations to *TaALMT1*. *Plant Journal*, 64, 446-455.
- Ryan, P. R., S. D. Tyerman, T. Sasaki, T. Furuichi, Y. Yamamoto, W. H. Zhang & E. Delhaize (2011) The identification of aluminium-resistance genes provides opportunities for enhancing crop production on acid soils. *Journal of Experimental Botany*, 62, 9-20.
- Sanjib K. Panda, Frantisek Baluska and H. Matsumoto (2009) Aluminium stress signalling in plants *Plant Signaling & Behavior* 4:7, 592-597; July 2009
- Schmohl, N. & W. J. Horst (2000) Cell wall pectin content modulates aluminium sensitivity of *Zea mays* (L.) cells grown in suspension culture. *Plant Cell and Environment*, 23, 735-742.
- Schmohl, N., J. Pilling, J. Fisahn & W. J. Horst (2000) Pectin methylesterase modulates aluminium sensitivity in *Zea mays* and *Solanum tuberosum*. *Physiologia Plantarum*, 109, 419-427.
- Schwarzerova, K., S. Zelenkova, P. Nick & Z. Opatrny (2002) Aluminum-induced rapid changes in the microtubular cytoskeleton of tobacco cell lines. *Plant and Cell Physiology*, 43, 207-216.
- Sivaguru, M. & W. J. Horst (1998) The distal part of the transition zone is the most aluminum-sensitive apical root zone of maize. *Plant Physiology*, 116, 155-163.
- Sivaguru, M., Y. Yamamoto, Z. Rengel, S. J. Ahn & H. Matsumoto (2005) Early events responsible for aluminum toxicity symptoms in suspension-cultured tobacco cells. *New Phytologist*, 165, 99-109.
- Sun, P., Q. Y. Tian, J. Chen & W. H. Zhang (2010) Aluminium-induced inhibition of root elongation in *Arabidopsis* is mediated by ethylene and auxin. *Journal of Experimental Botany*, 61, 347-356.
- Vonuekull, H. R. & E. Mutert (1995) GLOBAL EXTENT, DEVELOPMENT AND ECONOMIC-IMPACT OF ACID SOILS. *Plant and Soil*, 171, 1-15.
- Watanabe, T., S. Jansen & M. Osaki (2005) The beneficial effect of aluminium and the role of citrate in Al accumulation in *Melastoma malabathricum*. *New Phytologist*, 165, 773-780.
- Yamamoto, Y., Y. Kobayashi & H. Matsumoto (2001) Lipid peroxidation is an early symptom triggered by aluminum, but not the primary cause of elongation inhibition in pea roots. *Plant Physiology*, 125, 199-208.
- Yang, J. L., X. F. Zhu, Y. X. Peng, C. Zheng, G. X. Li, Y. Liu, Y. Z. Shi & S. J. Zheng (2011a) Cell Wall Hemicellulose Contributes Significantly to Aluminum Adsorption and Root Growth in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 155, 1885-1892.
- Yang, J. L., X. F. Zhu, C. Zheng, Y. J. Zhang & S. J. Zheng (2011b) Genotypic differences in Al resistance and the role of cell-wall pectin in Al exclusion from the root apex in *Fagopyrum tataricum*. *Annals of Botany*, 107, 371-378.
- Zheng S.J., Yang J.L. (2005) Target sites of aluminium phytotoxicity *BIOLOGIA PLANTARUM* 49 (3): 321-331, 2005